

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06072888 A**

(43) Date of publication of application: **15.03.94**

(51) Int. Cl

**A61K 35/78**

**A61K 35/78**

(21) Application number: **04253513**

(22) Date of filing: **31.08.92**

(71) Applicant: **TSUMURA & CO**

(72) Inventor: **KAMISHIRO MASAMICHI  
FUKUDA KAZUNORI  
MIZOGUCHI MITSUJI**

**(54) APOPTOSIS INDUCER**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain the subject medicine useful as a safe medicine of new type such as carcinostatic agent, anti-cancer agent and antiviral agent, inducing apoptosis of eliminating unnecessary pathogenic cells in organism, excellent TSUDOUSAN as an active ingredient.

**CONSTITUTION:** TSUDOUSAN comprising mixed crude medicine of nut of chinquapin, rhizome of Cimicifuga simplex, root of Angelica acutiloba, root of Glycyrrhiza glabra, flower of Carthamus tinctorium, bark of Magnolia officinalis, peel of Citrus unshu, stalk of Akebia quinata, stalk of Caesalpinia sappan, and anhydrous salt cake is extracted with purified water at 100°C for 60 minutes and the prepared extracted solution is subjected to solid-liquid separation by centrifuging. The prepared supernatant liquid is sterilely and clearly filtered by a membrane filter, the prepared filtrate is subjected to ultrafiltration by using a ultrafilter under 3kg/cm<sup>2</sup> pressure. The concentrated solution is spray dried into dried

essence powder. The essence powder is mixed with fine crystal cellulose and magnesium stearate, tableted by a tabletting machine to give the objective apoptosis inducer capable of effectively causing apoptosis in organism and eliminating unnecessary or pathogenic cells in a natural form.

**COPYRIGHT:** (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-72888

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 35/78

識別記号 庁内整理番号  
ADU W 7167-4C  
ADY 7167-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1(全5頁)

(21)出願番号 特願平4-253513

(22)出願日 平成4年(1992)8月31日

(71)出願人 000003665  
株式会社ツムラ  
東京都中央区日本橋3丁目4番10号  
(72)発明者 神代 正道  
福岡県福岡市中央区伊崎6-1  
(72)発明者 福田 一典  
福岡県北九州市小倉北区清水3丁目9-17  
(72)発明者 溝口 充志  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州02111,  
ボストン、トレモントストリート151、ア  
パートメント#26-J  
(74)代理人 弁理士 小野 信夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 アポトーシス誘起剤

(57)【要約】

【構成】 通導散を有効成分として含有するアポトーシス誘起剤。

【効果】 本発明の、アポトーシス誘起剤によれば、生体内で有效地にアポトーシスを引き起こすことが可能となる。このアポトーシスは壞死に基づく細胞の死と異なり、細胞自身に本来組み込まれている死であるため、自然な形で不要もしくは病原細胞を取り除くことができるものである。従って新しいタイプの安全な制癌・抗癌剤や、各種ウイルス感染が原因である多くの病気の治療剤等として有用なものである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 通導散を有効成分として含有するアポトーシス誘起剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、制癌剤、抗ウイルス剤等の医薬として利用可能なアポトーシス誘起剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス（apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅）という様式が見出され注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組み込まれている死であると考えられている。

【0003】 すなわち、なんらかの外部的または内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を元にプログラム死タンパク質が合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要もしくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。しかしながら、現在までアポトーシスを導く化合物として知られているものはグルココルチコイドだけであり、より優れたアポトーシス誘起作用を有する化合物の開発が求められていた。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、アポトーシス誘起作用をもつ化合物を見出だすべく、特に各種生薬について検索していたところ、通導散が優れたアポトーシス誘起作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は通導散を有効成分として含有するアポトーシス誘起剤を提供するものである。

【0007】 本発明において有効成分として用いられる通導散は、当帰、大黄、芒硝、枳実、厚朴、陳皮、木通、紅花、蘇木、甘草などの生薬を含む漢方薬であり、月経不順、月経痛、更年期障害、腰痛、便秘、打ち身、高血圧の随伴症状等の治療に用いられているものである。

【0008】 この通導散は、若干の異同があるが、一般に次の配合範囲のものである。

当 帰 3.0

大 黄 3.0

芒 硝 4.0～1.0

枳 実 3.0～0

枳 実	穀	3.0～0
厚 朴	2.0	
陳 皮	2.0	
木 通	2.0	
紅 花	3.0～2.0	
蘇 木	2.0	
甘 草	3.0～2.0	

【0009】 本発明のアポトーシス誘起剤は、上記配合の通導散をそのまま、もしくはその抽出物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組み合せ製剤化すれば良い。

【0010】 通導散の抽出物としては通導散の各種水系溶剤抽出物が挙げられるが、水抽出物を用いることが好ましい。具体的な通導散抽出物の調製例としては、上記範囲の組成の通導散を10～15倍量、好ましくは1.2倍量の熱水で抽出し、得られた抽出液を濾過する方法が挙げられる。この抽出物は必要に応じて乾燥させ、乾燥粉末とすることもできる。

【0011】 本発明のアポトーシス誘起剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

【0012】 医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスター、無機塩等が利用される。また、経口剤の調製にあたっては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することができる。これらの具体例としては、以下に示すものが挙げられる。

【0013】 (結合剤) デンプン、デキストリン、アラビアゴム末、ゼラチン、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール。

【0014】 (崩壊剤) デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース。

【0015】 (界面活性剤) ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ポリソルベート80。

【0016】 (滑沢剤) タルク、ロウ類、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム、ポリエチレングリコール。

【0017】 (流動性促進剤) 軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム。

【0018】また、経口用の液剤として、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤とすることができ、これらの各種剤型には矯味、矯臭剤、着色剤を配合しても良い。

【0019】一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である通導散もしくはその抽出物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレンギリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等強化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

【0020】このアポトーシス誘起剤の投与量は、投与経路、疾患の程度、被投与者の年齢等によって異なるが、一般には経口投与の場合、大人1日当たり通導散乾燥エキス量として1～10g程度となる量を1～3回に分けて投与すれば良い。

【0021】なお、本発明で用いる通導散はすでに漢方薬として長い歴史を有し、安全性が確認されたものであるので安心して使用することができる。例えば、マウスおよびラットに対し、投与限界である15g/kgの経口投与で死亡例が認められないことから明らかなように極めて安全性の高いものである。

#### 【0022】

【実施例】次に試験例および実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例等になんら制約されるものではない。

#### 【0023】試験例 1

下記方法により、通導散のアポトーシス誘起作用を調べた。

(1) 通導散添加培地の調製：細胞培養の基礎培地としては、ダルベッコ変法イーグル培地に5%の牛胎児血清、ペニシリン(100U/ml)及びストレプトマイシ(100μg/ml)を加えたものを用いた。同培地に、通導散の水性エキスを10mg/mlの濃度になるように加え、実験に供した。この濃縮培地を、同上の基礎培地で各濃度に希釈して実験に供した。希釈された通導散添加培地および非添加培地の浸透圧およびpHはヒトの生理的範囲であった。

(2) 細胞の形態学的变化の検討：KIM-1細胞株(肝細胞癌)およびKMC-1細胞株(肝内胆管癌株)をそれぞれT-75フラスコに5×10<sup>5</sup>個ずつ接種し、24時間基礎培地で培養後、40μg/mlおよび400μg/mlの濃度に調整した通導散添加培地と交換し、48時間後の細胞の形態学的变化を検討した。すなわち、浮遊してきた細胞を採取し、サイトスピニにてスライドに付着させた後、70%アルコールにて固定し、HE染色を行い、光学顕微鏡下に細胞の形態像を観察した。このうち、KIM-1細胞株についての形態像を図1(写真)に示す。この図から明らかによ

うに、通導散の存在により、KIM-1細胞株の細胞縮小、核濃縮等が認められた。

【0025】(3) DNAフラグメンテーションの検討：上記(2)と同様にして浮遊してきた細胞とスクランパーにて剥いだ固着細胞をまとめて冷PBSで2回洗浄後、これに、10mMトリス(pH8)、0.1M EDTA、0.5% SDSおよび20μg/ml RNase(シグマ社)の溶液を0.5ml/10<sup>6</sup>細胞となるように加えて37℃で1時間インキュベートし、更に、最終濃度100μg/mlとなるようプロテナーゼK(シグマ社)を加えた後、50℃で3時間インキュベートし、細胞ホモジネートを得た。これより、フェノールクロロホルムにて蛋白を除去し、エタノール沈澱にてDNAを回収した。このDNAをT10E1(10mM Tris-HCl/1mM EDTA)溶液に溶解後、10μgのDNAを0.5μg/mlのエチジウムプロマイドを加えた1.6%アガロースゲルによる電気泳動にて解析した。

【0026】この結果を図2(写真)に示す。図中、向かって右は、通導散400μg/mlを作用させたKIM-1細胞株から抽出したDNAを用いた電気泳動の結果を、中央は、通導散40μg/mlを作用させたKIM-1細胞株から抽出したDNAを用いた電気泳動の結果を、左は通導散を作用させないときの電気泳動の結果を示す(対照)。この結果から明らかなように、通導散を作用させた場合は約180bpの整数倍でDNAが切断された断片が検出された。

#### 【0027】(4) 結果

アポトーシスに特徴的なものとして、細胞縮小、クロマチン濃縮、核濃縮、細胞断片化等が知られている。また、この断片化により、DNAは180bpの整数倍のオリゴヌクレオソームに切断されることも知られている。上記(2)および(3)の結果は、全てアポトーシスが惹起されたことを示しており、通導散がアポトーシスを誘起することがこれらの結果から明かとなった。

#### 【0028】実施例 1

通導散の抽出物の製造例1：枳実150g、大黄150g、当帰150g、甘草100g、紅花100g、厚朴100g、陳皮100g、木通100g、蘇木100g、無水芒硝88gの混合生薬(通導散；1138g)に13.5kgの精製水を加え、100℃で60分間加熱抽出した。得られた抽出液を濾過後、スプレードライして225gの乾燥エキス粉末を得た。

#### 【0029】実施例 2

通導散の抽出物の製造例2：枳実3g、大黄3g、当帰3g、甘草2g、紅花2g、厚朴2g、陳皮2g、木通2g、蘇木2g、無水芒硝1.8gの混合生薬(通導散；22.8g)に275gの精製水を加え、100℃で60分間抽出した。得られた抽出液を遠心分離により固液分離し、得られた分離液を50℃以下でスプレー

ドライして4.5 gの乾燥エキス粉末を得た。

#### 【0030】実施例 3

通導散の抽出物の製造例3：枳実300 g、大黄300 g、当帰300 g、甘草200 g、紅花200 g、厚朴200 g、陳皮200 g、木通200 g、蘇木200 g、無水芒硝180 gの混合生薬（通導散；2.28 kg）に27.5 lの精製水を加え、加熱し、100℃になつてから1時間抽出した。得られた抽出液を遠心分離にかけ、残渣を分離して溶液20 lを得る。

【0031】この溶液を0.3 μmのメンブランフィルター（東洋濾紙社製）により無菌清澄濾過する。得られた濾液をダイアフィルターG-10T（バイオエンジニアリング社製；分画分子量100000）を用いて限外濾過する。この限外濾過は、内容積2.0 lの容器の下面に直径152 mmの膜をセットし、圧力3 kg/cm<sup>2</sup>で行ない、容器内の液が濃縮されるにつれ精製水約2 lを添加するというように実施した。この結果、限外濾過液20 lを得た。

#### 【0032】実施例 4

顆粒剤の調製：実施例1により調製した通導散の乾燥エキス粉末200 gを乳糖89 gおよびステアリン酸マグネシウム1 gと混合し、この混合物を単発式打錠機にて打錠し、直径20 mm、重量約2.3 gのスラッグ錠を作った。このスラッグ錠をオシレーターで粉碎し、整粒後篩別し、粒径20～50 メッシュの顆粒剤を得た。

#### 【0033】実施例 5

錠剤の調製：実施例2により調製した乾燥エキス粉末200 mgを微結晶セルロース20 gおよびステアリン酸マグネシウム5 gと混合し、この混合物を単発式打錠機にて打錠して直径7 mm、重量225 mgの錠剤を製造した。本錠剤1錠中には、通導散の乾燥エキス粉末を200 mg含有する。

#### 【0034】実施例 6

カプセル剤の調製：実施例2により調製した乾燥エキス粉末500 mgを硬カプセルに充填し、カプセル剤を調製した。

#### 【0035】実施例 7

注射剤の調製：実施例3で得た限外濾過液20 lにアラニン（発熱物質不含）300 gを添加、溶解し、凍結乾燥する。この凍結乾燥物を900本のバイアル瓶に分注して注射剤を得た。この注射剤1バイアルには、凍結乾燥物406 mgが含まれており、10 mlの精製水に容易に溶解した。また、溶解後の注射液は、9.2% (550 nm) の透過度を有しており、日本薬局方の発熱性物質試験法に適合していた。

#### 【0036】

【発明の効果】本発明の、通導散を有効成分とするアポトーシス誘起剤は、生体内で有効にアポトーシスを引き起こすことが可能となる。このアポトーシスは壞死に基づく細胞の死と異なり、細胞自身に本来組み込まれている死であるため、自然な形で不要もしくは病原細胞を取り除くことができるものである。

【0037】従来、例えば癌に対する制癌剤や抗癌剤としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、DNA合成阻害剤、免疫強化剤等の薬剤が利用されているが、これらのうちアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、DNA合成阻害剤等の薬剤では、癌細胞のみならず正常細胞に対しても影響を及ぼし、副作用が強すぎるという問題があり、また、免疫強化剤では作用が弱いという問題があった。

【0038】しかし、本発明のアポトーシス誘起剤を用いれば、癌細胞にもプログラムされているアポトーシスを引き起こし、不死とされている癌細胞を死滅させることができるので、新しいタイプの安全な制癌・抗癌剤として有利に使用することができる。また、従来排除が困難とされていた種々のウイルスが感染した組織や細胞についてもアポトーシスを引き起こし、これらの組織、細胞を除去することができるので、ウイルス感染が原因である多くの病気の治療等にも有用なものである。

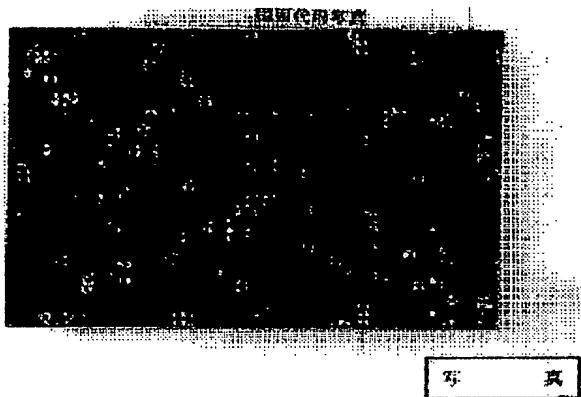
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 通導散の添加により変化したKIM-1細胞株の形態を示す写真

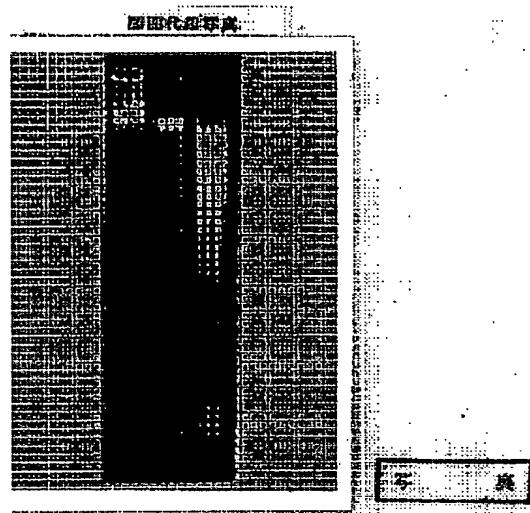
【図2】 通導散の添加により断片化したKIM-1細胞株のDNAを示す写真

以上

【図1】



【図2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成5年3月30日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】通導散の添加により変化したKIM-1細胞株の生物形態を示す写真である。

【図2】通導散の添加により断片化したKIM-1細胞株のDNAを示す電気泳動の写真である。